

La brucellose bovine en Afrique centrale

I. — Méthodes d'enquête utilisables en milieu tropical

par J. DOMENECH, P. LUCET et C. GRILLET

Adresse actuelle : I. E. M. V. T., 10, rue Pierre-Curie, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France

RÉSUMÉ

8 800 sérums ont été étudiés lors d'une série d'enquêtes sur la brucellose bovine en Afrique centrale.

Quelques conclusions peuvent être portées sur la valeur des différentes méthodes de travail utilisables en milieu tropical :

— efficacité accrue des tournées de brousse en adoptant des solutions peu coûteuses d'autonomie de froid et d'électricité. Les analyses sérologiques et les ensemencements de prélèvements se feront ainsi quotidiennement ;

— gains de temps et de réactifs appréciables grâce aux techniques sérologiques en microméthodes. Etant donné les quelques différences constatées, par rapport aux techniques de référence en tubes, ces réactions en plaques seront à réserver aux enquêtes épidémiologiques de routine ;

— simplicité d'exécution et très bonne sensibilité de l'épreuve à l'antigène tamponné (E. A. T.; ou card test), qui s'avère être la plus intéressante des réactions étudiées (E. A. T., S. A. W., F. C.) pour les enquêtes en milieu tropical.

INTRODUCTION

Les enquêtes, de plus en plus nombreuses, sur la brucellose bovine en Afrique, montrent que cette maladie est largement répandue sur le continent (4, 6, 9, 10, 11, 13, 16).

Avec des taux d'infection de 10 à 20 p. 100, et parfois plus, le cheptel de tous les pays africains s'avère contaminé.

Cependant, rares sont les programmes de prophylaxie mis en œuvre contre cette zoonose alors que, au fur et à mesure que progresse la lutte contre les fléaux majeurs de l'élevage bovin, la brucellose apparaît comme une entité morbide très préjudiciable à l'économie de cet élevage.

Cette situation a été constatée sur les rives Sud du lac Tchad où, après plusieurs années d'actions sanitaires intensives de la part des vétérinaires de la Commission du Bassin du lac Tchad (C. B. L. T. - N'Djaména - Projet

F. A. C. - U. S. A. I. D.-Assalé-Serbewel), les éleveurs demandent instamment que leur cheptel soit libéré de ce « bakkale », rendu responsable d'un grand nombre d'avortements.

Cette sensibilisation des propriétaires de troupeaux bovins, ainsi que l'accent mis sur le phénomène avortement, nous a amené à élaborer un programme de travail, en trois ans, dont les principaux objectifs sont les suivants :

- Etude des techniques utilisables ;
- Appréciation de l'incidence et de l'importance économique ;
- Détermination des biotypes des souches ;
- Mise en place de schémas de prophylaxie médicale et, parfois, sanitaire applicables en Afrique centrale.

Les résultats obtenus font l'objet d'une série de publications, dont la première expose les méthodes d'enquête utilisables en milieu tropical.

I. MATÉRIEL et MÉTHODES

I.1. Travail sur le terrain

— Questionnaires :

Après identification, des questionnaires détaillés sont remplis, concernant l'âge des animaux, leur sexe, la carrière des femelles, les antécédents d'avortements ou de stérilité, le devenir des veaux (mortalités). Les signes d'hygromas et arthrites sont systématiquement recherchés.

- Prises de sang ;
- Traitement des sérums.

La centrifugation, la décantation et l'analyse des sérums par la réaction d'agglutination avec l'antigène coloré au Rose Bengale sont effectuées sur place quotidiennement.

Les sérums sont ensuite additionnés de merthiolate, puis congelés, et ramenés au laboratoire pour analyses complémentaires éventuelles.

— Prélèvements pour isolement des *Brucella* :

Les liquides d'hygroma, pus d'arthrites, mucus vaginaux, laits, placentas et contenus stomacaux des avortons sont ensemencés quotidiennement sur milieu *Brucella* agar modifié (Biomérieux), additionné de Polymyxine B, Bacitracine, Actidione, Vancomycine, Acide nalidixique et Nystatine.

Les boîtes de PÉTRI sont placées à + 37 °C, en atmosphère enrichie en CO₂ (Gaspak Anaerobic System).

Toutes ces manipulations nécessitent un matériel relativement important, dont 1 groupe électrogène 1,5 kW, un réfrigérateur (gaz-220 V-12 V), un congélateur à gaz, et une centrifugeuse électrique. Tout le petit matériel (boîte de PÉTRI, tubes, pipettes) est en matière plastique. L'incubation à + 37 °C est obtenue par des boîtes isothermes placées à l'extérieur le jour, dans les cases ou tentes la nuit.

I.2. Travail au laboratoire

I.2.1. Biotypie des souches

Les techniques classiques d'identification et de biotypie sont utilisées (1, 14).

I.2.2. Analyses sérologiques

— Epreuve à l'antigène tamponné (E. A. T.) ou Card-Test, ou épreuve au Rose de Bengale,

ou Rose de Bengale Test (R. B. T.) : antigène BENGAL TEST (Laboratoire IFFA-Mérieux). Après 4 mn d'agitation, la lecture est faite et les résultats notés + ou —. Seules sont prises en compte les agglutinations visibles à l'œil nu, même lorsqu'elles sont très fines (5, 8).

— Séro-agglutination lente en tubes, ou séro-agglutination de WRIGHT (S. A. W.). Technique de référence (14) : le seuil de positivité choisi est 30 UI/ml.

— Séro-agglutination en plaque : Matériel « Microtiter » (Cooke Engineering Co., U. S. A.), selon la technique décrite par RENOUX-PLOMMET et PHILIPPON (15).

Les plaques sont à fond rond ou conique.

L'antigène est soit l'antigène pour S. A. W. (Biomérieux), soit l'antigène pour « épreuve de l'anneau » coloré au chlorure de triphényl tétrazolium (IFFA-Mérieux) et dilué au 1/10.

Le seuil de positivité est 30 UI/ml.

— Fixation du complément (F. C.) en tube : Technique classique décrite par G. RENOUX et R. GAUMONT (14). Antigène Biomérieux.

Le seuil de positivité est la dilution au 1/2 (dilution initiale).

— Fixation du complément en plaque : On utilise le même antigène que pour la F. C. en tube, et le même matériel « Microtiter », plaques à fond conique, que pour la séro-agglutination en plaque. Même seuil que pour la technique en tubes.

Les techniques choisies sont soit celle de RENOUX-PLOMMET et PHILIPPON (15) (tous réactifs sous volume 0,025 ml), soit la technique modifiée par FENSTERBANK (7) : sérum (pur et dilutions) sous volume 0,050 ml, antigène, complément (4 unités) et système hémolytique sous volume 0,025 ml.

II. RÉSULTATS

II.1. Travail sur le terrain

— Questionnaires :

Des contrôles ont été faits auprès des propriétaires : questionnés plusieurs fois, à quelques mois d'intervalle, ils donnent les mêmes indications dans la plupart des cas, notamment sur les carrières de leurs femelles. Les réponses peuvent être considérées comme fiables.

— Traitement des sérums : La centrifugation, suivie de l'analyse immédiate des sérums permet de récupérer toutes les données de la journée : aucun prélèvement n'est ainsi écarté pour mauvaise conservation.

— Isolements : Ici aussi, la mise en culture quotidienne s'avère efficace : dans plus de 80 p. 100 des prélèvements brucelliques (cas des hygromas du genou par exemple) l'ensemencement est suivi d'un isolement de souche.

II.2. Techniques sérologiques

II.2.1. Comparaison antigène normal-antigène coloré au tétrazolium

Sur 1 000 sérums analysés, aucune différence de titre n'a été constatée, selon le type d'antigène utilisé.

La réaction avec l'antigène coloré au tétrazolium est cependant plus facile à lire.

II.2.2. Comparaison S.A.W. en plaque : fond arrondi-fond conique

— Sérums sous volume 0,025 ml : 1 000 sérums ont été testés avec ces deux types de plaques. Les résultats obtenus sont similaires. La lecture est peut-être plus facile avec les plaques à fond conique.

— Sérums sous volume 0,050 ml : Les mêmes 1 000 sérums donnent les mêmes résultats : pas d'écart entre les deux types de plaques.

II.2.3. Comparaison S.A.W. en tube-S.A.W. en plaque (fond conique)

Sur 2 000 sérums, l'écart entre la technique de référence, en tube, et la technique en plaque atteint 1 à 2 dilutions dans 17,4 p. 100 des cas.

II.2.4. Comparaison F.C. en tube - F.C. en plaque, sous volume 0,025 ml

Sur 1 100 sérums, l'écart entre la technique de référence en tube et la technique en plaque atteint 1 dilution dans 14,1 p. 100 des cas, et 2 dilutions dans 13,5 p. 100 des cas.

II.2.5. Comparaison F.C. en tube - F.C. en plaque sous volume 0,050 ml

Sur 1 300 sérums, l'écart atteint 1 dilution dans 36,3 p. 100 des cas, et 2 dilutions dans 19,2 p. 100 des cas.

II.2.6. Comparaison E. A. T. - S. A. W.

Le tableau I indique les résultats obtenus sur 8 803 sérums, dont 3 625 positifs.

TABL. N°I-Comparaison des techniques SAW et EAT

E.A.T.	S.A.W. positive (1)	2 856
Positive	S.A.W. suspecte (2)	358
	S.A.W. négative	342
3 556		
E.A.T.	S.A.W. positive	69
Négative	S.A.W. négative	278
	S.A.W. suspecte	4 903
5 250		

(1) Titre égal ou supérieur à 30 UI/ml ;

(2) Titre de 15 UI/ml.

II.2.7. Comparaison E. A. T. - S. A. W. - F. C. :

Les tableaux II, III et IV expriment les résultats observés sur 4 006 sérums provenant d'enquêtes banales, sur 1 398 sérums d'animaux vaccinés avec la souche B 19 et sur 177 sérums d'animaux atteints de brucellose clinique évidente (association de symptômes, d'hygroma du genou et d'avortements).

TABL. N°II-Comparaison des techniques E.A.T.-S.A.W.-F.C. : sérums provenant d'enquêtes épidémiologiques.

E.A.T.	Positive	S.A.W.	F.C. positive	650
			F.C. suspecte	8
		702	F.C. négative	44
	Suspecte	S.A.W.	F.C. positive	80
			F.C. suspecte	3
		112	F.C. négative	29
953	Négative	S.A.W.	F.C. positive	80
			F.C. suspecte	7
		139	F.C. négative	52
Négative	Positive	S.A.W.	F.C. positive	15
			F.C. suspecte	1
		46	F.C. négative	30
	Suspecte	S.A.W.	F.C. positive	23
			F.C. suspecte	17
		134	F.C. négative	94
	Négative	S.A.W.	F.C. positive	74
			F.C. suspecte	93
		2 873	F.C. négative	2 706

TABL. N°III-Comparaison des techniques E.A.T.-S.A.W.-
F.C.:sérums d'animaux vaccinés avec la souche B 19.

E.A.T.	Positive	S.A.W.	F.C. positive	1 090
			F.C. suspecte	0
		1 094	F.C. négative	4
	Positive	S.A.W.	F.C. positive	128
		Suspecte	F.C. suspecte	6
		134	F.C. négative	0
	Négative	S.A.W.	F.C. positive	41
			F.C. suspecte	7
		52	F.C. négative	4
E.A.T.	Positive	S.A.W.	F.C. positive	3
			F.C. suspecte	0
		4	F.C. négative	1
	Négative	S.A.W.	F.C. positive	15
		Suspecte	F.C. suspecte	5
		30	F.C. négative	10
	Négative	S.A.W.	F.C. positive	42
			F.C. suspecte	18
		84	F.C. négative	24

TABL. N°IV-Comparaison des techniques E.A.T.-S.A.W.-
F.C. : sérums d'animaux malades.

E.A.T.	Positive	S.A.W.	F.C. positive	165
			F.C. suspecte	0
		166	F.C. négative	1
	Positive	S.A.W.	F.C. positive	5
		Suspecte	F.C. suspecte	0
		5	F.C. négative	0
	Négative	S.A.W.	F.C. positive	5
			F.C. suspecte	0
		6	F.C. négative	1
E.A.T.	Positive	S.A.W.	F.C. positive, sus- pecte et négative	0
	Négative	S.A.W.	F.C. positive, sus- pecte et négative	0
	0	S.A.W.	F.C. positive, sus- pecte et négative	0

III. DISCUSSION

III.1. Travail sur le terrain

Dans les conditions pratiques de travail en milieu tropical, il est très souvent impossible de trouver une source d'électricité et de froid à proximité. Les tournées durent en général plusieurs jours, jusqu'à un mois parfois, étant donné les distances et la qualité médiocre des pistes à parcourir.

Il devient donc impératif de se dégager des contraintes liées à la rareté des villes nanties d'installations électriques.

Les solutions proposées ici permettent, avec 500 kg de matériel environ, d'assurer une analyse quotidienne des prélèvements, et d'augmenter ainsi l'efficacité d'un travail toujours coûteux à organiser.

De plus, le résultat immédiat des analyses constitue un facteur non négligeable de succès des enquêtes, auprès des responsables vétérinaires locaux, et même des éleveurs : la sensibilisation au problème étudié est bien meilleure que lorsque les résultats parviennent longtemps après l'intervention.

L'intérêt de la formule adoptée lors de ce travail (500 kg de matériel réparti dans des caisses étanches) réside dans le fait qu'un véhicule tout terrain léger peut parfaitement convenir : point n'est besoin de posséder un camion-laboratoire, lourd, peu maniable, notamment en saison des pluies, cher à l'achat et à l'entretien.

III.2. Techniques sérologiques

Avec la technique F. C. en plaque, sous volume 0,025 ml, les titres des sérums sont identiques, dans 72 p. 100 des cas, à ceux obtenus en tubes.

Avec la technique F. C. en plaque, sous volume 0,050 ml, cette proportion n'est que de 45 p. 100.

Ceci est dû au fait que, dans le second cas, 1 081 des 1 300 sérums analysés provenaient d'animaux vaccinés avec la souche B 19, et étaient donc tous positifs.

En fait, cette deuxième technique s'avère meilleure que la première.

Les quelques différences constatées, dans nos mains, entre les deux méthodes (en plaques et en tubes), nous incitent à choisir les techniques de référence en tubes pour les recherches sérologiques précises. En revanche, l'utilisation

des plaques sera tout à fait indiquée lors des enquêtes épidémiologiques de routine. Ces micro-méthodes apportent en effet une amélioration très sensible dans la rapidité d'exécution des analyses. Leur fidélité pourra peut-être augmenter par l'utilisation de diluteurs plus fiables, et de plaques dont le plastique ne risquera pas, par ses qualités d'adsorption, de modifier les conformations stéréochimiques et les interactions des réactifs.

— Les résultats obtenus avec la réaction E.A.T. sont conformes à ceux cités par de nombreux auteurs :

- Bien que l'antigène acide coloré au Rose de Bengale révèle les anticorps de la classe IgG1, tout comme la F. C. (5), le parallélisme entre les deux réactions est parfois mis en échec.

- L'expérience pratiquée sur les sérums provenant de zébus vaccinés avec la souche B 19 montre, par ailleurs, la chronologie de la disparition des anticorps post-vaccinaux qui se fait dans le sens : S. A. W. - E. A. T. - F. C.

- Au total, et cela est particulièrement visible à partir des résultats obtenus sur les 177 sérums d'animaux atteints de brucellose clinique, l'E. A. T. s'avère être la plus sensible des 3 réactions étudiées.

Cette conclusion nous a amené à choisir cette réaction à l'antigène coloré au Rose de Bengale pour toutes les enquêtes épidémiologiques effectuées en Afrique centrale : la simplicité et la rapidité de l'analyse sérologique sont en effet un atout considérable car on peut

ainsi multiplier les prélèvements, sans tenir compte des possibilités du service de sérologie du laboratoire.

- Tous les résultats exprimés sur la base des résultats de l'E. A. T. peuvent néanmoins être comparés à ceux donnés par d'autres auteurs utilisant la F. C. En revanche, les pourcentages de positivité en S. A. W. sont très en dessous, et ne peuvent être assimilés que très approximativement à ceux de l'E. A. T. ou de la F. C.

III.3. Méthodologie des enquêtes

Les premières enquêtes ont permis d'établir des corrélations entre les taux de positivité du cheptel total, des femelles de tous âges, ou des femelles reproductrices seules. Cherchant, avant tout, à accumuler un maximum de données statistiques sur les paramètres de production du troupeau (carrière des femelles, taux d'avortement, de fécondité, de mortalité des veaux), il nous paraît préférable de ne plus travailler que sur les femelles reproductrices. Disposant d'un temps et d'un budget donnés, on obtiendra ainsi deux fois plus de chiffres que si on veut saigner le cheptel dans son ensemble.

A partir du taux de positivité obtenu sur les femelles reproductrices, on passe à celui du cheptel entier en divisant par 1,5 et à celui de l'ensemble des femelles en divisant par 1,3.

Ces extrapolations sont évidemment grossières, et n'ont pour autre but que de permettre la comparaison entre les différents auteurs



Photo n° 1. — Conditions d'enquête en milieu tropical.

IV. CONCLUSIONS

De cette étude sur les méthodes utilisables en milieu tropical, nous retiendrons les conclusions suivantes :

— Nécessité absolue de travailler sur le terrain en autonomie de froid et d'électricité. Les solutions pratiques et peu coûteuses existent, et sont à la portée de la plupart des laboratoires nationaux africains.

— Utilité des microtechniques sérologiques,

qui apportent une simplification dans le travail de laboratoire.

— Supériorité de l'épreuve à l'antigène tamponné (E. A. T.) qui, par sa sensibilité et sa simplicité, permet une analyse rapide des sérums prélevés sur le terrain :

— Possibilité d'accumuler suffisamment de chiffres sur les paramètres zooéconomiques en n'enquêtant que parmi les femelles reproductrices : on pourra ainsi effectuer un calcul statistiquement valable sur les pertes économiques dues à la brucellose.

SUMMARY

Bovine brucellosis in Central Africa :

I. — Survey methods in tropical environment

8 800 serums were tested during a series of surveys on bovine brucellosis in Central Africa.

A few conclusions can be drawn on the value of the various techniques available in tropical environment :

— enhanced effectiveness of bush touring by opting for cheap techniques of cold storage and power autonomy so that, serological tests and sample seeding, can be done daily ;

— substantial saving of time and reagents thanks to serological techniques and microtests. Owing to a few differences noted between the latter and the classical tube tests, plaque techniques should be used only for routine epidemiological surveys ;

— the Rose Bengal test convenience and its very good sensibility make it the most interesting of all reactions studied (R. B. T., S. A. W., F. C.) for surveys in tropical environment.

RESUMEN

La brucelosis bovina en Africa central :

I. — Métodos de encuesta utilizables en medio tropical

Se estudiaron 8 800 sueros durante una serie de encuestas sobre la brucelosis bovina en Africa central.

Los resultados de la utilización de los diferentes métodos de trabajo en medio tropical permiten concluir lo siguiente :

— Eficacia aumentada de las visitas en sabanas con matorrales adoptando soluciones poco costosas de autonomía de frío y de electricidad. Así, los análisis serológicos y las siembras de muestras pueden hacerse cada día ;

— Ganancias de tiempo y de reactivos apreciables gracias a las técnicas serológicas en micrométodos.

Dadas algunas diferencias observadas con relación a las técnicas de referencia en tubos, estas reacciones en placas tendran que ser reservadas a las encuestas epidemiológicas de rutina ;

— Sencillez de ejecución y sensibilidad muy buena de la prueba con el antígeno taponado (E. A. T. o card test) que se revela la más interesante de las reacciones estudiadas (E. A. T., S. A. W., F. C.) para las encuestas en medio tropical.